



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/63, 5/18, C07K 14/47, C12P 21/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/14324</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月25日(25.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04125</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月11日(11.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/267846 1997年9月12日(12.09.97)</p> <p>(71) 出願人；および (72) 発明者 榊 佳之(SAKAKI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒236-0045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南2-51-42 Kanagawa, (JP)</p> <p>(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 程 肇(TEI, Hajime)[JP/JP] 〒113-0032 東京都文京区弥生1-5-10-503 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MAMMALIAN GENES PARTICIPATING IN CIRCADIAN PERIOD</p> <p>(54)発明の名称 サークァディアン周期に関与する哺乳動物遺伝子</p> <p>(57) Abstract A human gene and a mouse gene corresponding to <i>Drosophila</i> period gene which has been known as participating in the circadian period. The proteins and DNAs are applicable to the treatment of diseases relating to the circadian rhythm such as sleep stage regression syndrome, sleep stage progression syndrome, non-circadian agrypnotic syndrome, irregular agrypnotic disorder and time difference syndrome (i.e., so-called jet lag), labor and health management of those working until late at night irregularly, prevention of night poriomania in dementia, etc.</p>		

(57)要約

サーカディアン周期に関与することが知られているショウジョウバエperiod遺伝子に対応するヒト遺伝子およびマウス遺伝子が提供された。本発明のタンパク質およびDNAは、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間型睡眠覚醒症候群、不規則型睡眠覚醒障害、時差症候群（いわゆる時差ボケ）等のサーカディアンリズムに関連する疾患の治療、さらに深夜不規則労働者の労務および健康管理、痴呆症の夜間徘徊の予防等に適用可能である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		

明細書

サーカディアン周期に関与する哺乳動物遺伝子

技術分野

本発明は、サーカディアン周期で発現が変動する哺乳動物遺伝子に関する。

背景技術

微生物から脊椎動物にわたる広範な生物における、多くの生化学的過程、生理学的過程、および行動学的過程が、サーカディアンリズム（概日リズム）を示す（Edmunds, L.N.J. Cellular and Molecular Basis of Biological Clock. (Springer-Verlag, New York, 1988)）。サーカディアンリズムについてはいくつかの遺伝子に関与することが示唆されている。

例えば、これまでに2つの哺乳動物サーカディアン時計変異が確認されている。マウスのClock (Vitaterna, M.H., et al., Science 264, 719-725 (1994)) およびハムスターのtau (Ralph, M.R. & Menaker, M., Science 241, 1225-1227 (1988)) である。Clock遺伝子は最近同定されたものであり、サーカディアン時計における転写因子をコードしていると考えられている (Moore, R.Y. & Eichler, V. B., Brain Res. 42, 201-216 (1972); Stephen, F.K. & Zucker, I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1583-1586 (1972))。一方、tau遺伝子は、未だクローニングされていない。

また、ショウジョウバエにおいては、運動活性および羽化行動のサーカディアンリズムの発現に必要な遺伝子として、period (per) 遺伝子が単離されている (Konopka, R.J. & Benzer, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2112-2116 (1971))。ハエ脳においてはper mRNAおよびPERIOD (dPER) タンパク質のレベルの振動が、リズムを決定していると考えられている (Hardin, P.E., et al., Nature 343, 536-540 (1990); Zerr, D.M., et al., J. Neurosci. 10, 2749-2762

(1990))。しかしながら、昆虫以外のperホモログは全く同定されていない。

発明の開示

本発明は、サーカディアン周期に関与する新規な哺乳動物タンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。特に、ショウジョウバエのperiod (per) 遺伝子産物と同様の機能を有する哺乳動物タンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。

本発明者等は上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、サーカディアンリズムに関与することが知られているショウジョウバエ遺伝子において機能的に重要な役割を担っていると考えられている領域に着目し、該領域の配列を基に作製したプライマーを用いて独自開発したPCRを行なうことにより、上記ショウジョウバエ遺伝子に対応するヒト遺伝子を単離することに成功した。また、本発明者等は、単離したヒト遺伝子をプローブとして用いることにより、該ヒト遺伝子に対応するマウス遺伝子を単離することにも成功した。さらに、本発明者等は、単離したヒトおよびマウス遺伝子がコードするタンパク質の構造につき解析を行った結果、これらタンパク質がショウジョウバエタンパク質において同定されている機能ドメインおよび構造ドメインを高度に保存していることを見いだした。本発明者等は、さらに、哺乳動物の脳においてサーカディアンペースメーカーとしての役割を担う領域である視交叉上核における単離したマウス遺伝子の発現の解析を行った結果、該遺伝子の発現が実際にサーカディアン周期で変動することを見いだした。

即ち、本発明は、哺乳動物のサーカディアン周期に関与するタンパク質およびその遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 視交叉上核 (SCN) においてサーカディアン周期で発現量が変動する哺乳動物由来のタンパク質、
- (2) 哺乳動物がヒトである、(1)に記載のタンパク質、

- (3) 哺乳動物がマウスである、(1)に記載のタンパク質、
 - (4) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質、
 - (5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質、
 - (6) 配列番号：3に記載のDNAまたは配列番号：3に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質、
 - (7) 配列番号：4に記載のDNAまたは配列番号：4に記載のDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質、
 - (8) (1)乃至(5)のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、
 - (9) 配列番号：3に記載のDNAまたは配列番号：3に記載のDNAとハイブリダイズするDNAであって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質をコードするDNA、
 - (10) 配列番号：4に記載のDNAまたは配列番号：4に記載のDNAとハイブリダイズするDNAであって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質をコードするDNA、
 - (11) (8)乃至(10)のいずれかに記載のDNAを含むベクター、
 - (12) (8)乃至(10)のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、
 - (13) (12)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)乃至(7)のいずれかに記載のタンパク質の生産方法、
- に関する。

なお、本発明において「サーカディアン周期」とは、生物の内分泌や体温・血圧・睡眠覚醒等の広範な行動に認められる約24時間周期の活動リズムをさす。

本発明のタンパク質は、哺乳動物の脳における主要なサーカディアンペースメーカーである視交叉上核 (SCN) (Moore, R.Y. & Eichler, V.B., Brain Res. 42, 201-216 (1972); Stephen, F.K. & Zucker, I., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 69, 1583-1586 (1972)) において、その発現が自律的にサーカディアン周期で振動する。本発明のタンパク質に含まれるヒトおよびマウス由来のタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1と配列番号：2に示す。これら2つの哺乳動物タンパク質のアミノ酸配列はショウジョウバエのタンパク質 (period遺伝子産物) と最も高い相同性を示す (Citri, Y., et al., Nature 326, 42-47 (1987))。ショウジョウバエにおいては、period遺伝子が、運動活性および孵化行動のサーカディアンリズムの発現に必要である (Konopka, R.J. & Benzer, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2112-2116 (1971))。ハエ脳におけるそのmRNAおよびタンパク質のレベルの振動が、リズムを決定していると考えられている (Hardin, P.E., et al., Nature 343, 536-540 (1990); Zerr, D.M., et al., J. Neurosci. 10, 2749-2762 (1990))。これら2つの哺乳動物タンパク質は、遺伝学的研究および生化学的研究から、構造的、機能的に重要であることが示唆されているPASドメイン (Baylies, M.K. et al., Nature 326, 390-392 (1987); Saez, L. & Young, M.W., Neuron 17, 911-920 (1996)) においてショウジョウバエのタンパク質と特に高い相同性を有する。

最近、Kingらにより、bHLH-PAS-polyQポリペプチドをコードする哺乳動物クロック遺伝子「Clock」がクローニングされた (King, D.P., et al., Cell 89, 641-653 (1997); Antoch, M.P., et al., Cell 89, 655-667 (1997))。本発明のタンパク質は、サーカディアン時計システムにおいて、PAS-PAS相互作用を通して「CLOCK」などの他の分子とダイマーを形成している可能性がある。

本発明のタンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質とし

て、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質であれば、後述の本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質であれば、例えば、上記本発明の組換えタンパク質を基に抗体を調製し、該抗体を適当な担体に結合させたアフィニティーカラムにより、脳、脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、心臓、脾臓、精巣などの体細胞組織から単離することが可能である。

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1に記載のタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、配列番号：1または2に記載のタンパク質と実質的に同一のタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより配列番号：1または2に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、視交差上核（SCN）のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、ODA(Oligonucleotide-directed Dual Ambe r)-LA PCR法 (Hashimoto-Gotoh T., et al.(1995) Gene 152 271-275、参照) が挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。

さらに、当業者にとっては周知技術であるハイブリダイゼーション技術 (Church, G. M. & W. Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81 1991-1995; Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning (2nd Ed.)) などを用いて、配列番号：3または4に記載のDNA配列（またはその一部）を基に、他の生物からこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから配列番号：1または2に記載のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を得ることも通常行いうることである。このように配列番号：3または4に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、視交差上核（SCN）のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダ

イズするDNAの由来となる他の動物、特に哺乳動物の例としては、例えば、ラット、イヌ、ネコ、サル、クジラ、ウシ、ブタ、ウマが挙げられる。なお、このような他の生物由来のタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：3または4に記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性を有するとは、配列番号：3または4に記載のDNAと、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上の配列の同一性を有することをいう。このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションは、例えば、6×SSPE、5×Denhardt's溶液、0.5% SDS、100 μg/ml変性サケ精子DNA、50%ホルムアミドという系で、通常は42°Cで、穏やかな条件としては32°Cで、厳しい条件としては65°Cで行うことができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のタンパク質をコードするDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、例えば、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：3または4に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。

組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好適に用いられる。これら細胞内で組換えタンパク質を発現させるために用いられるベクターとしては、それぞれ、pET系等、pAUR系等、バキュロウイルスベクター（pBlue Bac等）、CMVまたはRSVプロモーター系ベクターが挙げられる。

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、大腸菌および酵母ではエレクトロポレーション法、昆虫細胞および動物細胞ではリボソーム法等の方法により行うことができる。また、酵母には、酢酸リチウム法を用いることもできる。

得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、例えば、イオン交換、ゲル濾過、抗Per抗体カラムを用いて行うことができる。

本発明のタンパク質またはDNAは、サーカディアンリズムに関連する疾患、例えば、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間型睡眠覚醒症候群、不規則型睡眠覚醒障害、時差症候群（いわゆる時差ボケ）等の治療に適用可能である。また、深夜不規則労働者の労務および健康管理、痴呆症の夜間徘徊の予防等にも適用可能である。

図面の簡単な説明

図1は、IMS-PCRにおけるプライマー配列を設計するために用いたPASリピート内のアミノ酸配列（矢印）を示す図である。

図2は、3bpのラダーマーカを、非連続緩衝液条件で10%非変性PAGEゲル上で泳動させた電気泳動像を示す写真である。なお、レーンMには、10bpのDNAラダー（BRL）を泳動させた。

図3は、IMS-PCRのPCR産物（矢印で示したレーン）を、59bp、65bp、および68bpの3bpラダーマーカ（アステリスクで示したレーン）と並べて泳動させた電気泳動像を示す写真である。

図4は、PERIODファミリーのアミノ酸配列の比較を示す図である。hDIAL、mDIAL、PERIODは、それぞれヒト、マウス、ショウジョウバエのPERIODを示す。四角で囲まれた、斜線または点による網掛け部分は相同配列、C1～C6はショウジョウバエ種間で保存されているPERIODの領域を示す。

図5は、PERIODファミリーのアミノ酸配列の比較を示す図である。hDIAL、mDIAL、PERIODは、それぞれヒト、マウス、ショウジョウバエのPERIODを示す。相同配列は斜線または点による網掛けにより示した。NLS、PAS-Aリピート、PAS-Bリピート、およびCLDに対応する配列には下線を引き、TGリピート（ヒトおよびマウスのPERではSGリピート）を四角で囲んだ。ヒトPERIODとマウスPERIODとの間のアミ

ノ酸同一性は、ヒトPERIOD配列の上のアステリスクにより示した。哺乳動物PERIODとショウジョウバエPERIODとの同一性および類似性は、それぞれ、ショウジョウバエPERIOD配列の下のアステリスクおよび丸印により示した。

図6は、hPERのノーザンブロット解析を示す写真である。フィルターに、hPERをプローブとして結合させ、次にローディングコントロールとしてG3PDHをプローブとして結合させた。

図7は、mPerのノーザンブロット解析を示す写真である。フィルターに、mPerをプローブとして結合させ、次にローディングコントロールとしてG3PDHをプローブとして結合させた。

図8は、LD（上）およびDD（下）条件下でのマウス脳中のmPerのインサイチュールハイブリダイゼーションを示す写真である。SCNは矢印で示した。目盛りは2mmを示す。

図9は、LD（上）およびDD（下）条件下でのインサイチュールハイブリダイゼーションデータを定量した結果を示す図である。各値は、平均値±SEM（n=5）である。ZT16またはCT16における値と比較して（ANOVA）、**は有意水準1%で有意であり、*は有意水準5%で有意であったことを示す。棒の白い部分は明条件の期間、黒い部分は暗条件の期間を示す。

図10は、LD（上）およびDD（下）条件下でのmPer mRNAの競合RT-PCR解析を示す図である。△mPerはmPer競合因子を示し、△β-アクチンはβ-アクチン競合因子を示す。棒の白い部分は明条件の期間、黒い部分は暗条件の期間を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 perの哺乳動物ホモログの単離

perの哺乳動物ホモログを単離するため、本発明者らは、新規な方法、IMS（in

tramodule scanning) -PCRを開発した。本方法の原理は、ヒトゲノムにおいて、短いポリペプチド断片（モチーフ）をコードする短いDNA配列領域（モジュール）が、長いゲノム距離にわたり散在しているという事実に基づいている。遺伝子全長が包含されるように十分な数の「モジュール内スキャニング (intramodule scanning)」プライマーを用いると、PCRにより、その発現レベルに無関係に同じ頻度でモジュールをスクリーニングすることができる。

遺伝学的研究および生化学的研究から、dPERのPASドメインが構造的、機能的に重要であることが示唆されている (Baylies, M.K. et al., *Nature* 326, 390-392 (1987); Saez, L. & Young, M.W., *Neuron* 17, 911-920(1996))。そこで、本発明者らは、dPERのPAS-AリピートおよびPAS-Bリピート内の18種類のプライマー対を設計した (図1)。PAS-AリピートおよびPAS-Bリピートの縮重プライマー対の配列は、「GTGCTGGGCTACCCN(A/C)GNGA」、「CTGGGCTACCCCC(A/G)(A/G)GANATG」、「GGCTACCCCC(A/G)(A/G)GANATGTGG」、「CTGGGCT(A/T)CCTGCCNCA(A/G)」、「CTGGGCT(A/T)CCTGCCNCA(A/G)GA」、「GGCTACCTGCC(C/T)CA(A/G)GAN(C/T)」、「GCCCC(G/A)TCCTTCAG(G/A)TGNAC」、「TCCTCATG(A/G)TGCAC(A/G)(T/A)ANTC」、「ATGTCTCATG(A/G)TG(C/G)AC(A/G)(A/T)A」、および「GACAC(A/G)TCCTCATG(A/G)TG(A/G)TA」である。なお、A/Gなどの記号はAとGの混合プライマーであることを示す。

相同なポリペプチドは分子内の対応する位置に共通の特徴を有するため、対応するアミノ酸配列をPCRプライマーの合成に用いた場合、PCR産物の長さは、それぞれのポリペプチドにおけるドメイン構造の場所に関する特徴を反映する。ヒト遺伝子におけるコドン（各3bp）およびエキソン（各平均100bp）の長さを考慮に入れ、3bpのラダーマーカー（53～113bp）を、一連のプライマーおよびpUC19を鋳型としたPCRにより合成した。この3bpのラダーマーカーおよび10bpのDNAラダーマーカー（BRL）の電気泳動像を図2に示す。マーカーをPCR産物と並べて非連続的な緩衝液系 (Ito, T., Hohjoh, H. & Sakaki, Y., *Electrophoresis* 14, 278-282 (1993)) で非変性PAGE (10%) ゲル上を泳動させた (図3)。

各PCR混合液 (Sambrook, J., et al., Molecular cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)) には、0.5 μ gのヒトゲノミックDNAが含まれていた。混合液を94°Cで1分間インキュベートし、94°Cで30秒、37°Cで30秒、72°Cで30秒を3サイクル行い、その後、94°Cで30秒、45°Cで30秒、72°Cで30秒を25サイクル行った。

予測された長さのDNAバンドをクローニングし、その配列を決定した。あるプライマー対 (ペプチド配列5'「GYLPQD」および3'「FVHHEDI」に対応) を用いたネスティッドPCRで、12個のバンド由来の33クローン (59~74bp) のうち、65bpのクローンが特に6~21倍に増幅された。65bpの断片を含むゲノミックDNA配列には、全部で125アミノ酸からなるPAS-Bドメインに含まれる35アミノ酸残基をコードする106bpのエキソンが存在することが明らかとなった。対応するcDNAを単離し、ヒトPER (hPER) cDNAと名付けた。次に、hPERのcDNAをプローブとして用い、マウスホモログ (mPer) cDNAをクローニングした。決定した塩基配列を、hPERについては配列番号：3に、mPerについては配列番号：4にそれぞれ示す。hPER遺伝子およびmPer遺伝子は、FISHにより、それぞれ、2つの動物間でシンテニーの遺伝子座である17p12-13.1および11Bに位置することが示された。

hPERおよびmPerのcDNA配列には、それぞれ1290アミノ酸残基、1291アミノ酸残基をコードすると推定されるORFが含まれる (図5/hPER遺伝子産物の推定アミノ酸配列を配列番号：3に、mPer遺伝子産物の推定アミノ酸配列を配列番号：4にそれぞれ示す)。さらに、hPERとmPERとのアミノ酸配列の同一性の程度は92%であり、hPERおよびmPerが両種間で保存されていることは明らかである (図5)。BLASTプログラムを用いて重複のないアミノ酸データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、2つの哺乳動物PERはdPER (タイプA) と最も高い相同性を示した (Citri, Y., et al., Nature 326, 42-47 (1987))。哺乳動物PERとショウジョウハエPERとの有意な相同性は、5つの領域に集中していた (図4および5)：I) N末端相同領域 (それぞれhPERおよびmPERの残基44~131)、II) PAS-A (両PERホモログの残基217~282)、III) PAS-B (両PERホモログの残基338~456) およびPAS

-Bの直下流の配列（両PERホモログの残基457～485）、IV) perS 変異（サーカディアン周期を短くする）が起こる部位（残基589）の下流領域に相当する短いセグメント（両PERホモログの残基624～645）、ならびにV) PER-C領域のC末端に相同な領域（hPERの残基1006～1050、mPERの残基1005～1049）、それに続くセリンーグリシン（SG）リピート（hPERの残基1051～1072、mPERの残基1050～1071）、およびそれよりさらに下流の相同配列（hPERの残基1073～1108、mPERの残基1072～1107）。これらの領域における相同性の程度は、それぞれ44%、47%、56%、64%、37%である（図4）。確かに、PERホモログのPAS領域（領域IIおよびIII）がdPERの対応する領域と最も関連性が高いが、他の領域も強い相同性を示す。dPERにおいて、5つの構造ドメインおよび機能ドメインが同定されている：a) 核移行シグナル（NLS）（残基66～79）（Vosshall, L.B., et al., Science 263, 1606-1609 (1996))、b) dPERがTIMのNLSと相互作用するために必要なPASドメイン（残基233～490）（Saez, L. & Young, M.W., Neuron 17, 911-920(1996))、c) PAS-Bリピートの下流領域に位置する細胞質移行ドメイン（CLD）（残基453～511）（Saez, L. & Young, M.W., Neuron 17, 911-920(1996))、d) 自己ポリペプチドのPASドメインと相互作用するPER-C領域（残基524～685）（Huang, Z.J., et al., Science 267, 1169-1172 (1995))、ならびにe) ショウジョウバエの種特異的な求愛歌のリズムを調節する、トレオニンーグリシン（TG）リピート（残基694～748）およびその直下流領域（残基749～868）（Wheeler, D.A., et al., Science 251, 1082-1085 (1991))。このように、各哺乳動物PERにおけるNLS、PAS、CLD、PER-C内の2つの領域、ならびにTGリピートおよびその直C末端側のセグメントは、dPERと全く同一の順序で並んでいる。興味深いことに、PERホモログのC末端側の半分では、dPERのTGリピートが短いSGリピートで置き換わっている（図5）。PER-Cに隣接するこのセグメント、およびTGリピートのC末端側周辺に相同な配列は、dPERの本来の位置の約350残基下流に位置する（図4）。これらの領域も、ヒトおよびマウスで高度に保存されている（図5）。ショウジョウバエ種間で高度

に保存されている6つのPERセグメント (C1~C6) が同定されている (図4) (Colot, H.V., et al., EMBO J. 7 3929-3937 (1988))。カイコガ (silkmoth) におけるPERホモログの場合と同様に、dPERに相同な哺乳動物PERの部分は、dPERのC1~C3に相当する領域に集中している (図4) (Reppert, S.M., et al., Neuron 13, 1167-1176 (1994))。これらの発見に基づき、本発明者らは、hPERおよびmPerがperの構造的ホモログであると結論づけた。

[実施例2] hPERおよびmPerの発現

hPERおよびmPerの発現パターンを、ノーザンハイブリダイゼーションにより試験した。ノーザンハイブリダイゼーションは、ChurchおよびGilbertの方法 (Church, G. M. & Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1991-1995 (1984)) により行った。フィルターはClontech社から購入した。結果を、図6 (hPER) および図7 (mPer) に示す。約4.6kbの転写産物が、試験した成人のヒトおよびマウスの組織全てに検出された。しかし、解糖系の酵素であり、どの細胞でも多量にかつ比較的恒常的に発現しているG3PDH (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 転写産物のレベルと比較したhPER/mPer転写産物のレベルは、同一ではなかった。ショウジョウバエにおいて、脳以外の多くの組織にperの発現が検出されていることから、この広範なhPER/mPer発現の分布は、驚くべきものではない (Liu, X., et al., Genes Dev. 2 228-238 (1988); Saez, L. & Young, M.W., Mol. Cell. Biol. 8 5378-5385 (1988))。

[実施例3] マウス脳におけるmPer cDNAの分布

マウス脳におけるmPer cDNAの分布を、インサイチューハイブリダイゼーションにより試験した。マウス脳の連続的な皮質切片 (40 μ mの厚さ) は低温保持装置で調製した。インサイチューハイブリダイゼーションおよびmRNA定量的方法は、別に記載されている (Ban, Y., Shigeyoshi, Y., & Okamura, H., J. Neurosci. 17, 3920-3931 (1997))。ハイブリダイゼーションに用いた³³Pで標識したプローブは、mPer cRNAの5'側のセンス鎖およびアンチセンス鎖であった (ヌクレオチド

538~1752位；データは示していない）。¹⁴C-アクリル酸スタンダード（Amersham Inc. Plc.）を用いて相対光学濃度へと変換した後、画像解析装置（MCID、Imaging Research Inc.）と連結したマイクロコンピュータを用いることにより、BioMaxフィルム（Kodak）上の各切片の放射能を分析した。このデータをSCNと脳梁との等しい領域におけるシグナル強度間の差違に対して標準化した。SCNの吻側の端から尾側の端までの切片（1匹のマウス当たり10個の切片）の光学濃度の強度を合計し、その合計をこの領域におけるmPer mRNA量の測定値とした。その結果、皮質構造および非皮質構造を含む脳の大部分の領域においてmPer転写産物の弱いシグナルが検出された。梨状皮質の錐体細胞層、尾状被殻の脳室周辺部、視床核の多く、および小脳皮質の顆粒層には、より強いmPer mRNAシグナルが検出された。驚くべきことに、脳における最も高いmPer発現レベルは、特別な時点においてSCNで観察された（図8および9；以下に説明）。

SCNにおけるmPer発現の時間依存性を調べるため、マウスを12h明/12h暗（LD）条件下に収容することにより、環境に同調させた。SCNにおけるmPer mRNAをインサイチューハイブリダイゼーションおよび競合RT-PCR法により定量した。競合RT-PCRは、以下のように行った。まず、マウス脳の切片（0.5mmの厚さ）を「Mouse Brain Matrix」（Neuroscience Inc.、東京）で調製した。顕微解剖用針（直径600 μ m）を用いて、立体顕微鏡下で、凍結切片からSCNを左右対称に打ち出した。全RNAを、SCN（n=4）からTRIZOL溶液（BRL）を用いて抽出し、DNAaseI（Stratagene）で処理し、TRIAZOL LS溶液（BRL）を用いて精製した。「SUPERScript Pre amplification System」（BRL）を約1 μ gのRNAの逆転写に用い、mPerおよび β -アクチンのcDNAは競合PCR法により定量した。PCR産物を非変性PAGE（5.5%）ゲル上で泳動させ、「SYBR Green」（Molecular Probes）で染色した後、適当なバンド中のDNAを「FMBIOII fuluoroimageanalyzer」（日立）で定量した。mPerおよび β -アクチンの競合DNA断片は、各々のcDNAの内部欠失により構築した。mPer、mPer競合因子、 β -アクチン、および β -アクチン競合因子は、それぞれ482bp、246bp、

1228bp、1044bpであった。

この2つの方法（インサイチューハイブリダイゼーションおよび競合RT-PCR法）により、LDにおける同様の振動プロフィールが得られた（図8および10；上）。mPer mRNAの量は、明条件でピークに達し（ZT4からZT8／なおZTは、図8～10のようにLD条件における時間を表す）、暗条件で最も低下した（ZT16からZT20）（図9；上）。さらに、恒常的な暗条件（DD）において、自由継続変動が起こり（図8および10；下）、mPer mRNAレベルはCT4からCT8（なおCTは、図8～10のようにDD条件における時間を表す）でピークに達し、CT16からCT20で最も低下した（図9；下）。このように、SCNにおけるmPer mRNAが、恒常的な暗条件下で、強力に、自律的に、サーカディアン周期で発現することから、この遺伝子がサーカディアンリズムペースメーカーとして機能していることが示唆される。SCNにおけるmPer mRNAのサーカディアン周期変動は、この脳領域における神経の活動度と類似しており（Inouye, S-T. & Kawamura, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5962-5966 (1979); Schwartz, W.J. & Gainer, H., Science 197, 1089-1092 (1977); Gillette, M.U. & Reppert, S.M., Brain Res. Bull. 19, 135-139 (1987))、mPer mRNAレベルは日中にピークに達し、夜中に最少となる。mPerがSCNにおける神経の活動度の調節因子として機能していることが考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明によりサーカディアン周期に関与する新規な哺乳動物タンパク質およびその遺伝子が提供された。本発明のタンパク質およびDNAは、哺乳動物において、サーカディアンリズム異常を正常化することができると考えられるため、サーカディアンリズムに関連する疾患、例えば、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間型睡眠覚醒症候群、不規則型睡眠覚醒障害、時差症候群（いわゆる時差ボケ）等を治療するために有効である。また、深夜不規則労働者の労務および健康管理、痴呆症の夜間徘徊等にも適用可能である。

請求の範囲

1. 視交差上核 (SCN) においてサーカディアン周期で発現量が変動する哺乳動物由来のタンパク質。
2. 哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載のタンパク質。
3. 哺乳動物がマウスである、請求項 1 に記載のタンパク質。
4. 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質。
5. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質。
6. 配列番号：3 に記載の DNA または配列番号：3 に記載の DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質。
7. 配列番号：4 に記載の DNA または配列番号：4 に記載の DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質。
8. 請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。
9. 配列番号：3 に記載の DNA または配列番号：3 に記載の DNA とハイブリダイズする DNA であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質をコードする DNA。
10. 配列番号：4 に記載の DNA または配列番号：4 に記載の DNA とハイブリダイズする DNA であって、視交差上核 (SCN) のサーカディアン周期形成に関与するタンパク質をコードする DNA。
11. 請求項 8 乃至 10 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
12. 請求項 8 乃至 10 のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持する形質転換

体。

13. 請求項12に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1乃至7のいずれかに記載のタンパク質の生産方法。